



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12Q 1/68</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/50401</p> <p>(43) 国際公開日 1999年10月7日(07.10.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01574</p> <p>(22) 国際出願日 1999年3月26日(26.03.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/100096 1998年3月27日(27.03.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ヘリックス研究所 (HELIIX RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 村松正明(MURAMATSU, Masaaki)[JP/JP] 〒176-0022 東京都練馬区向山3-15-13 Tokyo, (JP)</p> <p>若尾 宏(WAKAO, Hiroshi)[JP/JP] 若尾りか(WAKAO, Rika)[JP/JP] 〒292-0814 千葉県木更津市八幡台5-29-6 Chiba, (JP)</p> <p>矢野和宏(YANO, Kazuhiro)[JP/JP] 〒292-0801 千葉県木更津市請西829 サンビレッジ木更津B-106号 Chiba, (JP)</p> <p>野口照久(NOGUCHI, Teruhisa)[JP/JP] 〒106-0047 東京都港区南麻布4-11-18-701 Tokyo, (JP)</p>	<p>陶山 明(SUYAMA, Akira)[JP/JP] 〒192-0372 東京都八王子市下柚木3丁目2番6-501 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: METHOD FOR DETECTING CHANGE IN GENE EXPRESSION BY TREATING WITH TEST COMPOUND</p> <p>(54)発明の名称 被検化合物処理による遺伝子発現の変化を検出する方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method for detecting a change in intracellular gene expression state induced by a treatment with a specific compound which comprises extracting intracellular mRNAs respectively from cells having been treated with the above compound and untreated cells (control) and comparing the constitutions of these mRNAs. In this method, a difference in the contents of cDNA having been hybridized with a specific probe can be measured by labeling cDNAs obtained from the isolated mRNAs with different fluorescent substances, mixing these cDNAs at a definite ratio and hybridizing them with the probe. Use of this method makes it possible to screen a gene the expression of which is changed by treating with a specific compound or to screen a compound capable of changing the expression of a specific gene.</p>		

(57)要約

特定の化合物で処理を行った細胞および該処理を行わない細胞（対照）のそれぞれから細胞内mRNAを抽出し、両者の構成を比較することによって、特定の化合物で処理したことによる細胞内の遺伝子発現の状態の変化を検出することが可能であることを見出した。ここにおいて単離したそれぞれのmRNAから得られるcDNAに異なる蛍光標識を施し、両者を特定の割合で混合して特定のプローブに対してハイブリダイズさせることにより、プローブにハイブリダイズしたcDNAの存在量の違いを蛍光色により検出することが可能であることを見出した。さらに、この検出法を利用して、特定の化合物処理により発現が変化する遺伝子のスクリーニングや特定の遺伝子の発現を変化させる化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見いだした。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LJ	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

被検化合物処理による遺伝子発現の変化を検出する方法

技術分野

本発明は、化合物処理による遺伝子発現の変化を検出する方法、化合物処理により発現量が変わる遺伝子のスクリーニング方法、発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

背景技術

従来、薬剤スクリーニングは細胞の増殖、生存、分化、アポトーシスなどの細胞生物学的現象の誘導、あるいは抑制を指標に行われてきた。これら細胞生物学的現象の多くは、遺伝子の誘導や抑制によって副次的にもたらされることが多く、どのような遺伝子が化合物処理により変化するかは細胞の運命決定に重要な情報を提供する。また低分子化合物による遺伝子発現レベルの変化をモニターすることは細胞生物学的効果のみならず、細胞毒性などについての検討にも用いられている。

2つの異なる状態の細胞（または組織）における遺伝子発現の違いを検出する方法としては、これまでにディファレンシャルハイブリダイゼーション法 (Gene 145: 313-314 (1994) Cloning and sequence analysis of the human SNAP25 cDNA. N. Zhao, H. Hashida, N. Takahashi & Y. Sakaki) やディファレンシャルディスプレイ (DD) 法 (FEBS Lett 351: 231-236 (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed. RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. T. Ito, K. Kito, N. Adati, Y. Mitsui, H. Hagiwara & Y. Sakaki) などが開発されている。これらの方法を用いてこれまでに、例えば、異なる発生段階の細胞や異なる細胞周期上の時期の細

胞、野生株と特定の遺伝子の欠損細胞における遺伝子発現の違いの検出、また
 は健全組織と病的組織における遺伝子発現の違いの検出などが行われてきた。
 しかしながら、これら検出はいずれも細胞内における本来の遺伝子の構成を
 変えることなく発現している遺伝子の比較のために用いられており、人工的に
 化合物による処理を行った細胞に内在している遺伝子発現の変化の検出に用い
 られた例はない。

発明の開示

本発明は、簡便かつ効率的に化合物処理による遺伝子の発現の変化を検出す
 る方法、簡便かつ効率的に化合物処理により発現量が変化する遺伝子をスクリ
 ーニングする方法、および簡便かつ効率的に遺伝子の発現量を変化させる化合
 物をスクリーニングする方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、特定の化合物
 で処理を行った細胞および該処理を行わない細胞（対照）のそれぞれから細胞
 内mRNAを抽出し、両者の構成を比較することによって、特定の化合物で処理し
 たことによる細胞内の遺伝子発現の状態の変化を検出することが可能であるこ
 とを見出した。ここにおいて本発明者らは、異なる細胞における特定の遺伝子
 の発現量の違いを蛍光を用いて検出する方法（Nature Biotechnology 14:1675
 -1680(1996) Expression monitoring by hybridization to high-density o

ligonucleotide arrays. David J. Lockhart, Helin Dong, Michael C. Byr
 nel, Maximilian T. Follett, Michael V. Gallol, Mark S. Chee, Mic
 hael Mittmann, Chunwei Wang, Michiko Kobayashil, Heidi Hortonl, and
 Eugene L. Brownl)に着目し、これを遺伝子発現の変化の検出に応用すべく鋭
 意研究を行った。その結果、本発明者らは、単離したそれぞれのmRNAから得ら
 れるcDNAに異なる蛍光標識を施し、両者を特定の割合で混合して特定のフロ
 ーに対してハイブリタイズさせ、フローにハイブリタイズしたcDNAの発する

蛍光色を検出した場合、プローブにハイブリダイズしたcDNAの存在量の違いにより蛍光色変動するため、これにより特定の化合物で処理したことによる細胞内の遺伝子発現の状態の変化を簡易かつ効率的に検出することが可能であることを見出した。さらに、本発明者等は、この検出法を利用して、特定の化合物処理により発現が変化する遺伝子のスクリーニングや特定の遺伝子の発現を変化させる化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見いだした。

即ち、本発明は、化合物処理による遺伝子の発現の変化を蛍光色の変化により検出する方法、並びにこれを利用した特定の化合物処理により発現量が変化する遺伝子のスクリーニング方法および特定の遺伝子の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法に関し、より具体的には、

(1) (a)「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群を特定のプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群中の特定のプローブDNAに対するハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、を含むことを特徴とする、該特定の化合物による細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法、

(2) 多数のプローブDNAに対して、同時にハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、(1)記載の方法、

(3) 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、(1)記載の方法、

(4) (a)「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離された

それぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群をプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群中の特定のDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、(f)ハイブリダイズしたcDNA量に差異があるプローブDNAを選択し、該プローブDNAに対応する遺伝子を選択する工程を含むことを特徴とする、該特定の化合物によって細胞内の発現量が増加する遺伝子のスクリーニング方法、

(5) 多数のプローブDNAに対して、同時にハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、(4)記載の方法、

(6) 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、(4)記載の方法、

(7) (4)～(6)のいずれかに記載の方法で検出される、特定の化合物によって細胞内の発現量が増加する遺伝子、

(8) (7)の遺伝子を含むベクター、

(9) (8)のベクターを保持する形質転換体、

(10) (7)の遺伝子がコードするアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチド、

(11) (a)「被検化合物で処理された細胞内のmRNA」と「該被検化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群をプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群の該プローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を該プローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、(f)ハイブリダイズしたcDNA量の差が検出された被検化合物を選択する工程、を含むことを特徴とする

る、「プローブDNAに対応する遺伝子」の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、

(12) 多数のプローブDNAに対して、同時にハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、(11)記載の方法、

(13) 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、(11)記載の方法、

(14) (11)～(13)のいずれかに記載の方法で検出される、特定の遺伝子の発現量を変化させる作用を有する化合物、
に関する。

本発明は、(a)「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群を特定のプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群中の特定のプローブDNAに対するハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、を含むことを特徴とする、該特定の化合物による細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法に関する。

本発明の検出法においては、まず「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」を単離する。本発明の検出法に用いられる化合物としては特に制限はなく、その作用による遺伝子発現の変化を検出したい所望の化合物を用いることが可能である。化合物は、天然由来であっても、人工的に合成されたものであってもよい。

化合物処理を行う細胞としては特に制限はなく、例えば、種々の動植物細胞、微生物細胞などを用いることが可能である。好ましい動物細胞の一例を示せば、3T3L1細胞、COS細胞、NT-2細胞、Ba/F3細胞などが挙げられる。本発明にお

いて化合物処理する細胞には、培養細胞のみならず、動物や植物体内の細胞も含まれる。細胞に対する化合物の処理は、例えば、動植物の培養細胞や微生物であればこれらを培養している培地に添加するなどの方法で行うことが可能である。また、動物体内の細胞であれば、血管内投与、腹腔内投与、脳室内投与、経口投与など当業者に公知の投与方法により投与することができる。

化合物処理を行った細胞内で発現しているmRNAは、当業者に公知の方法、例えば、グアニジウム法やオリゴdTカラムを用いた方法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons) により細胞から単離することが可能である。

次いで、被検化合物で処理された細胞および対照細胞から単離されたmRNAに対し逆転写を行いcDNA群を得る。mRNAの逆転写には、通常、単離された細胞内の全mRNAを用いるが、目的に応じて種々の方法で分画したmRNAを用いることも可能である。mRNAの逆転写は、例えば、オリゴdTをプライマーとして用いたスーパースクリプト法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons) などの方法により行うことが可能である。

次いで、それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す。蛍光標識としては特に制限はないが、例えば、ローダミン、FITC、Texas Red、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7などを用いることが可能である。蛍光標識は、例えば、ニックトランスレーション (例えば、GIBCO-BRL社製のキットが市販されている)、ランダムプライマーDNAラベリング (例えば、GIBCO-BRL社製のキットが市販されている)、逆転写酵素を用いてmRNAを鋳型に直接取り込ませる方法 (Schena, M. et al. (1995) Science 270, 467-470) によりcDNAに結合することが可能である。

次いで、それぞれの標識されたcDNA群を特定のプローブDNAにハイブリダイズさせる。用いられる特定のプローブDNAとしては、化合物処理による発現の変化を検出したい所望の遺伝子に対するプローブDNAを用いることが可能であり、特

に制限はない。標識されたcDNA群と特定のプローブDNAとのハイブリダイズは、当業者に公知の方法（例えば、「Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons」や「Schena, M. et al. (1995) Science 270, 467-470」参照）により行うことが可能である。

次いで、それぞれの標識されたcDNA群中の特定のプローブDNAに対するハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する。例えば、一方のcDNA群をローダミン標識し、もう一方のcDNA群をFITC標識し、両者を混合して特定のプローブに作用させた場合には、特定のプローブDNAにハイブリダイズするDNA中にローダミン標識されたcDNAとFITC標識されたcDNAが等量存在する場合には黄色の蛍光、FITC標識されたcDNAが多く存在する場合には緑色の蛍光、ローダミン標識されたcDNAが多く存在する場合には赤い蛍光を発するため、蛍光色を検出することにより簡易に特定のプローブDNAにハイブリダイズするDNA量の差（量の多少）を検出することが可能である。蛍光色の検出は、例えば、走査型レーザー共焦点顕微鏡（オリンパス社製 1X70タイプ）、FMB10（日立ソフト社製）などを用いて行うことが可能である。

本発明の検出法においては、多数のプローブDNAを用いることも可能である。この場合には、多数のプローブDNAを基盤上に結合させたチップ（以下、「ゲノムチップ」と称する）（米国特許第5,405,783号明細書参照）を用いると化合物処理による多くの遺伝子の発現の変化を簡易かつ効率的に検出することができる。上記の蛍光色による検出法においては、例えば、ゲノムチップの基盤ガラス上に固着させた多数のプローブDNA上でハイブリダイゼーションを行い、各プローブにハイブリダイズするcDNAの蛍光強度を走査型レーザー顕微鏡を用いて検出することにより同時に多数の異なるcDNA量を検出することが可能である。ゲノムチップを用いる検出法には、反復操作を簡便に行うことが可能であり、かつ廉価であるという利点もある。

上記本発明の検出法により、cDNA量の差異を示す蛍光色が検出されれば、該cDNAに対応するプローブDNAを選択し、該プローブDNAに対応する遺伝子を選択することにより、細胞内で発現量が変化する遺伝子をスクリーニングすることができる。即ち、本発明は、また、(a)「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群をプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群中の特定のDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、(f)ハイブリズしたcDNA量に差異があるプローブDNAを選択し、該プローブDNAに対応する遺伝子を選択する工程を含むことを特徴とする、該特定の化合物によって細胞内の発現量が変化する遺伝子のスクリーニング方法に関する。

本発明のスクリーニング法においては、本発明の方法によって発現の変化が検出された遺伝子の中から、所望の遺伝子（例えば、一定値以上の発現量の増加が認められた遺伝子や一定値以上の発現量の減少が認められた遺伝子など）を選択する。選択された遺伝子は、ハイブリダイズしたプローブDNAが既知であれば、該プローブDNAと同一の塩基配列を有するものか、類似の塩基配列を有するものとして特定することが可能である。本発明のスクリーニング法により、化合物処理により細胞内の発現量が変化する遺伝子が単離されれば、該遺伝子を適当なベクターに挿入し、このベクターを宿主細胞に導入して、得られた形質転換体から該遺伝子にコードされるタンパク質を調製することが可能である。ベクターの導入される宿主細胞としては、例えば、種々の動物細胞（例えば、COS細胞など）、大腸菌（*E. coli*）、酵母、昆虫細胞などを用いることが可能である。ベクターとしては、COS細胞やNT-2細胞には「pME18Sベクター」（Mol Ce

11 Biol 8: 466-72 (1988) SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Y. Takebe, M. Seiki, J. Fujisawa, P. Hony, K. Yokota, K. Arai, M. Yoshida & N. Arai) などが、大腸菌 (*E. coli*) 細胞には「pETベクター」(タカラ社製) などが、昆虫細胞にはBacPacベクター(クローンテック社製) などが好適に用いられる。ベクターの宿主細胞への導入は、常法、例えば、大腸菌の場合にはエレクトロポレーション法など、COS細胞の場合にはリポフェクタミン (GIBCO-BRL社製) 法、昆虫細胞ではバキュロウイルス感染を用いた方法などにより行うことが可能である。組み換えタンパク質を発現した形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、タンパク質の性質に応じ種々のクロマトグラフィー、電気泳動、ゲルろ過などの常法を適宜組み合わせて行うことが可能である。また、His-tag法やHA-tag法によるカラム精製などを行うことも可能である。

また、上記本発明の検出方法において、cDNA量の差異を示す蛍光色が検出されれば、該cDNAを単離した細胞の処理を行った被検化合物を選択することにより、細胞内で特定の遺伝子の発現を変動させる化合物をスクリーニングすることができる。即ち、本発明は、また、(a)「被検化合物で処理された細胞内のmRNA」と「該被検化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群をプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群の該プローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を該プローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、(f)ハイブリダイズしたcDNA量の差が検出された被検化合物を選択する工程、を含むことを特徴とする、「プローブDNAに対応する遺伝子」の発現量を変

化させる化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法において細胞の処理を行う化合物としては、例えば、化合物のライブラリーが用いられる。化合物のライブラリーは、当業者に公知の方法（例えば、Application of combinatorial library methods in cancer Research and Drug Discovery. Lann, K.S. (1997) Anticancer Drug Des 12:145-167）により調製することが可能である。このスクリーニング法において、特定の遺伝子の発現量の変化を検出するために用いるプローブDNAとして、例えば、疾患に関連する遺伝子に対応するプローブDNAを用いれば、単離された化合物は、該疾患の治療薬の候補となり得る。

図面の簡単な説明

図1は、レチノイン酸およびFCS処理した3T3L1細胞において発現が誘導される遺伝子を検出した結果を示す図である。ナイロンメンブレン上には、ディフュージョンスクリーニングにより得られたレチノイン酸およびFCS処理した3T3L1細胞に特異的であると考えられる48のクローンが2つずつ結合させた。「A」から「H」までのそれぞれの群において、「1」と「2」、「3」と「4」、「5」と「6」、「7」と「8」、「9」と「10」、「11」と「12」が同一のクローンである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例を挙げてより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 3T3L1細胞における誘導遺伝子の検出

3T3L1細胞（10%FCSを含むDMEM培地で継代）をコンフルエントにして、無血清のDMEM培地で18時間インキュベートした後、無添加で（A群）、または1 μ Mレチノイン酸（RA）+10%FCSの添加を行い（B群）、3時間後に細胞を採取した。A、B両群からmRNAをmRNA Isolation System（GIBCO-BRL社製）を用いて行った

。mRNAはOligodT(12)をテンプレートに、SuperScriptII (GIBCO-BRL社製)と添付バッファーを用いて逆転写してファーストストランドcDNAを作製した。さらにこれをテンプレートにDIG-11-dUTPによる標識をDIGラベリング&デテクションキット (Boehringer Mannheim社製)を用いて行い、標識cDNA (A) および標識cDNA (B) を調製した。

3T3L1細胞cDNAライブラリー (1 μ Mレチノイン酸 (RA) +10%FCSの添加) と3T3L1細胞cDNAライブラリー (無添加) に対してディファレンシャルスクリーニングを行い、これにより単離された陽性クローン (1 μ Mレチノイン酸 (RA) および10%FCSを添加した3T3L1細胞由来のcDNAライブラリーに特異的であると考えられるcDNA) 48クローンを選択し、ナイロンメンブレン上に1.5mm間隔で2つつつスポットし、UVクロスリンクを行った。このメンブレンに対し、HybSeq (Stratagene社製) をバッファーに標識cDNA (A)、標識cDNA (B) を2時間、42度 $^{\circ}$ Cでハイブリダイズさせた。洗浄は2XSSC (室温、42度 $^{\circ}$ C、2回つつ)、次いで0.2XSSC、68 $^{\circ}$ C、1回を行い、Kodak X0-Matに感光させて検出した。その結果、図1に示すように3T3L1細胞においてレチノイン酸およびFCSによって誘導される遺伝子 (A34, A56, B12, B34, B56, F56) が検出された。

[実施例2] DNAが基盤上に固定されたチップの作製

以下の光リソグラフィ法によりガラス基盤上に配列1から6 (それぞれ配列番号: 1から6に記載した) のオリゴDNA (表1) の結合を行った (Hermanson, G. T., et al., "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., San Diego, CA(1992); Robertson, S. A., et al., J. Am. Chem. Soc., 113, 2722-2729(1991))。

表 1

配列 1 : 5'-AGCAGCAGCAACGAGCCCTCCTCCGACTCCCTGAGCTACCCACGCTGCTGGCCCTG TGA--3'
配列 2 : 5'-CTCCGACTCCCTGAGCTACCCACGCTGCTGGCCCTGTGA--3'
配列 3 : 5'-CCACGCTGCTGGCCCTGTGA--3'
配列 4 : 5'-TGGCTCCATCCTGGCCTCACTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGA GTA-3'
配列 5 : 5'-TGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'
配列 6 : 5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'

即ち、スライドガラス (MATSUNAMI, S0313) を 0.05M HCl で表面を 1 時間処理し、超純水で数回洗浄した後、エタノールに浸した。次いで、スライドガラスを A 液 (ジエチルエーテル : トルエン = 1 : 1)、B 液 (トルエン)、C 液 (トルエン : 3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシラン = 10 : 1) の順で溶液に浸した後、C 液で浸したスライドガラスをコンテナごとデシケーターにいれ窒素ガスで置換した後、一晩アミノシラン化反応を行った。次いで、スライドをエタノールで数回洗浄し、さらに超純水で 2 時間洗浄した。その後、デシケーターの中で真空下に乾燥させた (文献「Hermanson, G.T. et al., Academic Press, Inc., San Diego, California (1992)」参照)。キャッピング剤 (4,5-ジメトキシ-2-ニトロベンジルクロロホルメート) 10mg/ml (THF = テトラヒドロフランに溶解) をシラン化の終わったプレートに乗せて 10 分間反応させた後、THF、超純水の順で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた (文献「Robertson, S.A. et al., J. Am. Chem. Soc. 113, 2722-2729 (1991)」参照)。1mM 酢酸カリウム (pH 4.5) をデキャップした

いスライド上の位置に乗せ、顕微鏡下で水銀ランプの励起光(330-380フィルター)にて光照射を30分間行い、デキャップした。反応後、超純水で数回洗浄した。10mM DSS(Disuccinimidyl suberate)をスライドに塗付し、10分間反応させた後、洗浄し窒素ガスを吹き付けて乾燥させた。更に、0.2 μ lのオリゴDNA(100 μ M)を表面にのせて3分間反応させた。その後、TE(Tris-HCl(pH7.5), EDTA 1mM)を数回かけて未反応NHS基をなくし、超純水で洗浄、窒素ガスで乾燥させた。

なお、配列1, 2, 3はc-fos遺伝子検出用のプローブ (Cell 32: 1241-55 (1983) [MUID:83180421] Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. C. Van Beveren, F. van Straaten, T. Curran, R. Muller & I. M. Verma) であり、配列4, 5, 6は β -アクチン検出用のプローブ (J Mol Evol 23: 11-22 (1986) [MUID:86200234] Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. S. Alonso, A. Minty, Y. Bourlet & M. Buckingham) である。

[実施例3] 培養細胞よりmRNAの調製および蛍光標識cDNAの合成

培養細胞Ba/F3に12-o-テトラデカノイルフォルボル-13-アセテート (TPA) を1 μ Mおよび対照としてDMSOを添加した (それぞれを(a)群、(b)群とする)。30分後に細胞を採取し、mRNAを「Quick prep micro mRNA purification kit」(ファルマシア社製) を用いて調製した。(a)群、(b)群より得られたmRNAのOD値を計測して濃度を統一後、逆転写酵素反応を「cDNA first strand kit」(ファルマシア社製) を用いて行い、cDNAを調製した。このとき (a) 群より調製したサンプルには「Cy5-dCTP」(バイオリジカル・デテクション・システムズ社製) を取り込ませてcDNAを蛍光標識した。(b) 群より調製したサンプルには「FluorX-dCTP」(バイオリジカル・デテクションシステムズ社製) を取り込ませてcDNAを標識した。

【実施例 4】 蛍光標識cDNAとガラス基盤上の合成DNAのハイブリダイゼーション

(a)、(b)両群のサンプルより調製された蛍光標識cDNAを等量混合した後、ガラス基盤上でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、6XSSPE、サケ精子DNA0.5mg/mlに蛍光標識cDNA混合液を添加したものをを用いて、50°Cで16時間行い、その後6XSSPE (25°C)、0.5XSSPE (50°C) で洗浄した。

【実施例 5】 ハイブリダイズした蛍光標識cDNAの検出

蛍光標識cDNAはガラスプレートリーダーを用いて検出した。このリーダーはオリンパスの落射型蛍光顕微鏡にホルダーそれに検出用のSTI高感度カメラ（浜松ホトニクス）を組み合わせたものである。その結果、c-fos遺伝子検出用のプローブである配列1、2、3を結合した部位からはFluorXから生ずる緑色の干渉波長が認められた。一方、 β -アクチン検出用のプローブである、配列4、5、6を結合した部位からはFluorX、Cy-Sから生ずる黄色の干渉波長が認められた。このことから、(a)群、(b)群のサンプル中で β -アクチンmRNA量は同じであるがc-fos mRNA量はA群で有意に高いことが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、化合物処理による遺伝子発現の変化を検出する方法、化合物処理により発現量が変化する遺伝子のスクリーニング方法、発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法が提供された。これらの方法においては、発現の変化を検出に用いる各cDNA群に異なる蛍光標識を用いれば、蛍光色を指標として遺伝子発現の変化を簡便に検出することが可能である。また、多数のプローブDNAを結合させたゲノムチップを利用すれば、遺伝子発現の変化を効率的に検出することが可能である。

請求の範囲

1. (a)「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群を特定のプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群中の特定のプローブDNAに対するハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、を含むことを特徴とする、該特定の化合物による細胞の遺伝子発現の状態の変化を検出する方法。
2. 多数のプローブDNAに対して、同時にハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、請求項1記載の方法。
3. 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、請求項1記載の方法。
4. (a)「特定の化合物で処理された細胞内のmRNA」と「特定の化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群をプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群中の特定のDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を該特定のプローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、(f)ハイブリズしたcDNA量に差異があるプローブDNAを選択し、該プローブDNAに対応する遺伝子を選択する工程、を含むことを特徴とする、該特定の化合物によって細胞内の発現量が変化する遺伝子のスクリーニング方法。
5. 多数のプローブDNAに対して、同時にハイブリダイゼーションを行うこと

を特徴とする、請求項 4 記載の方法。

6. 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、請求項 4 記載の方法。

7. 請求項 4～6 のいずれかに記載の方法で検出される、特定の化合物によって細胞内の発現量が変化する遺伝子。

8. 請求項 7 の遺伝子を含むベクター。

9. 請求項 8 のベクターを保持する形質転換体。

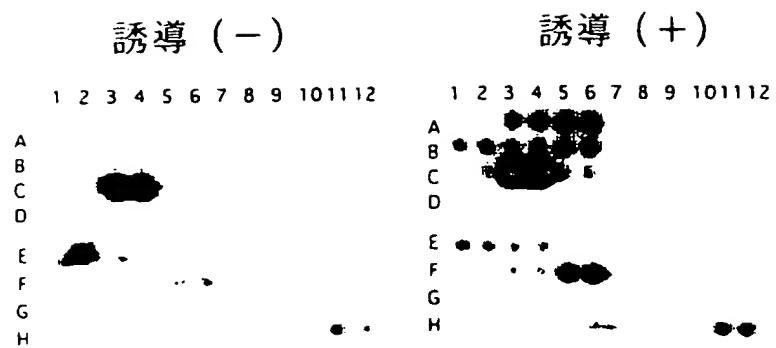
10. 請求項 7 の遺伝子がコードするアミノ酸配列を含むタンパク質またはペプチド。

11. (a)「被検化合物で処理された細胞内のmRNA」と「該被検化合物で処理されていない細胞内のmRNA」とをそれぞれ単離する工程、(b)単離されたそれぞれのmRNAに対して逆転写を行いcDNA群を得る工程、(c)それぞれのcDNA群に対して異なる蛍光標識を施す工程、(d)それぞれの標識されたcDNA群をプローブDNAにハイブリダイズさせる工程、(e)それぞれの標識されたcDNA群の該プローブDNAにハイブリダイズするcDNA量の差を該プローブDNAにハイブリダイズしたcDNAが発する蛍光色によって検出する工程、(f)ハイブリダイズしたcDNA量の差が検出された被検化合物を選択する工程、を含むことを特徴とする、「プローブDNAに対応する遺伝子」の発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法。

12. 多数のプローブDNAに対して、同時にハイブリダイゼーションを行うことを特徴とする、請求項 11 記載の方法。

13. 一方のcDNA群に対してローダミン標識を行い、もう一方のcDNA群に対してFITC標識を行うことを特徴とする、請求項 11 記載の方法。

14. 請求項 11～13 のいずれかに記載の方法で検出される、特定の遺伝子の発現量を変化させる作用を有する化合物。



SEQUENCE LISTING

<110> Helix Reseach Institute

株式会社ヘリックス研究所

<120> A Method Detecting the Change of Gene Expression Induced by Compounds

被検化合物処理による遺伝子の発現の変化を検出する方法

<130> H1-802PCT

<150> JP 1998-100096

<151> 1998-03-27

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 1

agcagcagca acgagccctc ctccgactcc ctgagctcac ccacgctgct ggccctgtga 60

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 2

ctccgactcc ctgagctcac ccacgctgct ggccctgtga

40

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 3

ccacgctgct ggccctgtga

20

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 4

tggctccatc ctggcctcac tgtccacctt ccagcagatg tggatcagca agcaggagta 60

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 5

tgtccacctt ccagcagatg tggatcagca agcaggagta 40

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 6

tggatcagca agcaggagta

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01574

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tampaku kougaku series tampaku kougaku ni okeru idenshi hatsugen no chousetsu", edited by Kin'ichirou Miura, 20 May, 1991 (20. 05. 91), Kodansha Ltd., pages 129 to 131	7-10, 14
X	JP, 5-192199, A (Pfizer Inc.), 3 August, 1993 (03. 08. 93) & EP, 534640, A1 & FI, 9204242, A & CA, 2078703, A & US, 5643730, A	1-14
P, A	JP, 11-46772, A (Masayuki Yamamoto), 23 February, 1999 (23. 02. 99) (Family: none)	1-14
P, A	JP, 10-304880, A (Shiseido Co., Ltd.), 17 November, 1998 (17. 11. 98) (Family: none)	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
22 June, 1999 (22. 06. 99)

Date of mailing of the international search report
29 June, 1999 (29. 06. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

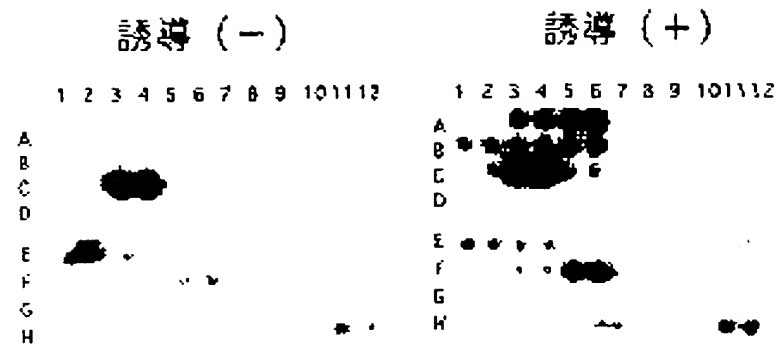
Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C12N15/00, C12Q1/68		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C12N15/00, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	三浦謹一郎編「蛋白工学シリーズ 蛋白工学における遺伝子発現の調節」20.5月.1991(20.05.91)講談社 p.129~131	7-10, 14
X	JP, 5-192199, A (ファイザー・インコーポレイテッド) 3.8月.1993 (03.08.93) & EP, 534640, A1 & FI, 9204242, A & CA, 20787 03, A & US, 5643730, A	1-14
P, A	JP, 11-46772, A (山本雅之) 23.2月.1999 (23.02.99) (ファミリーなし)	1-14
P, A	JP, 10-304880, A (株資生堂) 17.11月.1998 (17.11.98) (ファミリーなし)	1-14
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「I」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	22.06.99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 滝本 晶子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

1/1

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

株式会社ヘリックス研究所

<120> A Method Detecting the Change of Gene Expression Induced by Compounds

被検化合物処理による遺伝子の発現の変化を検出する方法

<130> H1-802PCT

<150> JP 1998-100096

<151> 1998-03-27

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 1

agcagcagca acgagccctc ctcgactcc ctgagctcac ccacgtgct gccctgtga 60

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 2

ctcgactcc ctgagctcac ccacgtgct gccctgtga

40

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 3

ccacgtctgt ggccctgtga

20

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 4

tggtccatc ctggctcac tgccacett ccagcagatg tggatcagca agcaggagta 60

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 5

tgccacett ccagcagatg tggatcagca agcaggagta 40

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
synthesized DNA sequence

<220>

<223> single-stranded, linear form.

<400> 6

tggatcagca agcaggagta

20

XP-002174621

AN - 1999-580760 [49]
AP - WO1999JP01574 19990326
CPY - HELI-N
DC - B04 D16
DS - AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE
FS - CPI
IC - C12N15/00 ; C12Q1/68
IN - MURAMATSU M; NOGUCHI T; SUYAMA A; WAKAO H; WAKAO R; YANO K
MC - B04-E01 B04-E08 B04-F0100E B11-C08E5 B12-K04 D05-H09 D05-H12 D05-H12E
D05-H14 D05-H17 D05-H19
M1 - [01]
- [02] M423 M710 M905 N102 Q233; RA00H3-N
- [03] M423 M710 M905 N102 Q233; RA00GT-N
M2 - [04] C108 D011 D022 D029 D210 G015 G100 H4 H402 H442 H8 J0 J011 J1
J131 K0 L2 L220 L7 L730 M1 M113 M280 M320 M412 M511 M520 M531 M540
M781 M904 M905 N102 P831 Q233; R06265-K R06265-U
- [05] D011 D013 D022 D029 D041 D111 D210 H1 H101 H142 J5 J521 L9 L942
M280 M320 M412 M512 M520 M530 M540 M781 M904 M905 N102 P831 Q233;
05935; RA04G8-K RA04G8-U
M6 - [06] M905 P831 Q233 R614 R625 R639
PA - (HELI-N) HELIX RES INST
PN - WO9950401 A1 19991007 DW199949 C12N15/00 Jpn 026pp
PR - JP19980100096 19980327
XA - C1999-169044
XIC - C12N-015/00 ; C12Q-001/68
AB - WO9950401 NOVELTY - Method for detecting a change in intracellular
gene expression induced by treatment with a specific compound
comprising obtaining cDNA copies of isolated intracellular mRNAs,
fluorescently labeling the cDNA groups, and hybridizing the labeled
cDNA groups with specific probe DNAs, is new.
- DETAILED DESCRIPTION - The method for detecting a change in
intracellular gene expression induced by treatment with a specific
compound comprises:
- (a) isolating intracellular mRNAs from treated and untreated cells;
- (b) transcribing the isolated mRNAs to give cDNA groups;
- (c) applying different fluorescent labeling to the cDNA groups;
- (d) hybridizing the respective labeled cDNA groups with specific probe
DNAs; and
- (e) measuring the difference in contents of cDNAs based on the
generated fluorescence after hybridization.
- INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:
- (i) a gene obtained after screening as above;
- (ii) a vector containing the gene of (i);
- (iii) a transformant containing the vector of (ii);
- (iv) a protein or peptide encoded by the gene of (i);
- (v) a method of screening for a compound capable of changing the
expression of a gene corresponding to a probe DNA by performing steps
(a)-(e) as described above, together with (f) selecting a compound
that can produce a difference in hybridized cDNA contents; and
- (vi) a compound identified by the above method that has the ability to
change the expression of a specific gene.

- USE - The method is useful for screening for a gene whose expression is changed by treatment with a specific compound, or screening for a compound capable of changing the expression of a specific gene.
- ADVANTAGE - The method is convenient and efficient because labeling with different fluorescent substances can be incorporated to aid detection of changes, including the application of a multi-probe DNA binding genome chip.
- (Dwg.0/1)

CN - RA00H3-N RA00GT-N R06265-K R06265-U RA04G8-K RA04G8-U

DN - CA JP US

IW - DETECT GENE EXPRESS FLUORESCENT LABEL USEFUL SCREEN GENE COMPOUND
CAPABLE CHANGE SPECIFIC GENE EXPRESS

IKW - DETECT GENE EXPRESS FLUORESCENT LABEL USEFUL SCREEN GENE COMPOUND
CAPABLE CHANGE SPECIFIC GENE EXPRESS

INW - MURAMATSU M; NOGUCHI T; SUYAMA A; WAKAO H; WAKAO R; YANO K

NC - 021

OPD - 1998-03-27

ORD - 1999-10-07

PAW - (HELI-N) HELIX RES INST

RRL - 05935

TI - Detection of gene expression with fluorescent labels, useful for screening genes and compounds capable of changing specific gene expression